

·编者按·

自《中华人民共和国食品卫生法》对保健食品进行法制化管理以来,我国的保健食品研究出现了新的高潮。本刊选登了一些文章。这些文章既有管理方面的,也有检验方面的,检验包括功能性试验和有效成分的检验。作者们在研究中进行了大量的探索与实践,在有些方面取得了共识,在有些方面有不同的见解。无论是共识还是不同见解,都是令人可喜的,都是对保健食品研究的推动。欢迎进行保健食品研究的同志们积极参与研究和讨论,百花齐放、百家争鸣,将保健食品的研究引向深入。

·论著·

保健食品抗疲劳作用试验方法研究

何来英 严卫星 楼密密
冯永全 刘红蕾 卫生部食品卫生监督检验所 (100021)

摘要 为评价各种抗疲劳作用保健食品的功效,建立了一套试验方法,包括:运动耐力试验(游泳试验)、肝糖原、血清尿素氮和血乳酸测定。经过反复验证,证明所建方法稳定、可靠,能真实地检测出产品的实际功效。可操作性强,仪器要求简单,除乳酸测定仪外,无需其它特殊的仪器,一般实验室都能开展实验。

关键词 保健食品 疲劳 运动耐受性 肝糖原 血尿素氮 乳酸盐类 小鼠

1 疲劳的概念

在近百年来的研究中,提出过多种有关疲劳的概念,其中影响较大的是 1935 年 E. Simonson 提出的疲劳概念,^[1]认为疲劳时存在四个基本过程:

- (1) 代谢基质疲劳产物的积累(积累假说);
- (2) 活动所需基质耗竭(衰竭学说);
- (3) 基质的生理化学状态改变;
- (4) 调节和协同机能失调。

1982 年在第 5 次国际运动生化学术会议上,将疲劳定义为:机体生理过程不能持续其机能在一特定的水平和/或不能维持预定的运动强度。运动性疲劳可分为躯体性疲劳和心理性疲劳。^[1]躯体性疲劳主要表现为运动能力下降,心理性疲劳主要表现为行为的改变。所谓抗疲劳,就是延缓疲劳的产生和/或加速疲劳的消除。

2 材料和方法

2.1 选择方法的依据

躯体性疲劳是由运动引起机体一系列生化改变而导致的肌肉力量下降。因此,疲劳的评价方法主要有两种:耐力试验和生化改变的检测。疲劳的宏观表现主要是运动时能量体系输出的最大功率下降和肌肉力量下降。测定机体持续运动至力竭的时间可以反映机体的耐力。运动时在机体出现疲劳的感觉之前,机体已发生了各种生化改变,也正是由于这些生化改变才导致了疲劳感觉的发生。因此可以用引起疲劳的生化指标来研究疲劳的发生及其发展变化过程。生化指标有以下几类:(1)能量物质:血糖、肝糖原、肌糖原、磷酸肌酸。(2)代谢调节物质:酶、激素。(3)代谢产物:血和肌肉中的乳酸、氢离子浓度、丙酮

酸、血尿素氮等。但并非所有因运动而变化的生化指标都适合作为疲劳或抗疲劳作用的评价指标,因为运动负荷的大小与机体的生化改变程度并不都是一致的,只有运动时变化明显、其变化程度与运动负荷和强度一致的指标才能作为疲劳或抗疲劳的评价指标。作为保健食品功能学评价的常规检测指标,还应具有检测方法灵敏、操作简便易行、检测结果能客观反映机体的疲劳程度等特点。考虑到以上因素,我们选择运动耐力试验和肝糖原、血清尿素氮、血乳酸 3 项生化指标。

2.1.1 运动耐力试验

疲劳的最主要表现是运动耐力的下降,运动耐力是反映机体疲劳最直接、最客观的指标。运动耐力的测定方法有运动跑台、爬杆和游泳。运动跑台有滚筒式和平板式两种,该装置较贵,不便于推广。爬杆装置简单,但有的小鼠并非因疲劳落地,而是不愿爬才跳下来的,并且因小鼠趾甲的抓损和杆的光洁度等因素很难保持一致,因此爬杆实验结果不如游泳试验结果可靠。游泳试验装置简单,且实验结果能客观地反映机体的体能,最为常用。

2.1.2 肝糖原测定

机体供能物质有糖、脂肪和蛋白质,糖是肌肉活动时能量的重要来源。大强度运动 2 h 左右,肌糖原近于耗竭。长时间紧张运动中体力的衰竭总是和肌糖原的耗竭同时发生,^[2]因此糖原的含量能说明疲劳发生的快慢或程度。肌糖原消耗的同时,为维持血糖水平,肝糖原储备量减少。如果受试物组肝糖原明显高于对照组,且差异有显著性,则说明该受试物能够通过增加肝糖原储备或/和减少运动时肝糖原的消耗,从而为机体提供更多的能量来达到抗疲劳的目的。因此,肝糖原含量是一个较敏感的指标。

2.1.3 血清尿素氮测定

运动时的供能物质有糖、脂肪和蛋白质。一般运动时间不超过 30 min 时,蛋白质较少参与供能,血尿素氮变化不明显;较长时间运动后,当机体长时间不能通过糖、脂肪分解代谢获得足够的能量时,蛋白质与氨基酸分解代谢加强,血尿素氮才明显增加。机体血尿素氮含量随运动负荷的增加而增加。身体对负荷的适应性越差,则产生的尿素氮越多。且蛋白质分解代谢加强不仅发生在不适应的运动时,还会延续到运动后的休息期,血中尿素氮可在运动后较长时间持续升高。^[4]

2.1.4 血乳酸测定

剧烈运动时,机体相对缺氧,糖酵解加快,产生大量乳酸,使肌肉中 H^+ 浓度上升,pH 值下降,导致疲劳。乳酸在体内的积累取决于乳酸的产生与消除速度。因此,减少乳酸的产生或加快乳酸的消除,都可延缓疲劳发生和/或加速疲劳的消除。血乳酸水平可以反映有氧代谢能力、疲劳的产生和消除速度。

2.2 材料

2.2.1 实验动物

昆明种小鼠,雄性,体重 18~22 g,购自军事医学科学院动物繁育中心。设受试物高、中、低 3 个剂量组,溶剂对照和水对照(如溶剂为水,则只设水对照),每项试验共 4 或 5 个组,每组 15 只。

剂量设置 一个剂量组为人体推荐量的 10 倍(小鼠与人的等效剂量约为 10 倍),往上或下再设 2 个剂量组(最大不超过人体推荐量的 30 倍)。

2.2.2 仪器与器材

乳酸测定仪(美国 Yellow 公司产品)、乳酸测定膜(美国 Yellow 公司产品)、匀浆器、天平、分光光度计、离心机、振荡器。游泳箱、铅皮(购自渔具店)、解剖器械、温度计、表、锅、电炉、试管、平皿、滤纸、12.0 mL 和 0.5 mL 塑料离心管、毛细管(20 μ L)、离心管等。

2.2.3 试剂

蒽酮试剂中含 0.05% 蒽酮,1% 硫脲,用 72% 硫酸配制。蒽酮试剂的配制方法:^[3]①72% 硫酸的配制:烧杯中加入 280 mL 蒸馏水,再加入高纯度浓硫酸(分析纯、比重 1.84) 720 mL。②蒽酮试剂配制:当硫酸温度降至 80~90℃ 时加入 500 mg 纯蒽酮,10 g 高纯度的硫脲,适当摇动烧杯混匀。冷却后存于冰箱中,可保存两周。最好现用现配。

尿素氮测定试剂盒(二乙酰一肟应用液、氯化铁磷酸应用液、20 mg/dL 尿素氮标准液)。测定乳酸用的乳酸标准液、缓冲液和破膜液(均为美国 Yellow 公司产品)。

2.3 方法

2.3.1 游泳试验

为缩短游泳时间,一般采用负重游泳的方法。连续经口给予受试物 30 d,于末次给样 30 min 后,鼠尾根部负小鼠体重 5% 的铅皮,放入水温为 25℃、水深 35 cm(一般不少于 25 cm)的游泳箱中。每一批小鼠下水之前均将水温调至 25℃,并将室温恒定在 25℃。每只水箱一次放入 5 只小鼠。用秒表记录自游泳开始至力竭死亡的时间,该时间为小鼠的游泳时间。试

验结果用方差分析或 t 检验。如果受试物组游泳时间比对照组长,且差异有显著性,则可判断为该受试物可延长小鼠游泳时间。

2.3.2 肝糖原测定

连续经口给予受试物 30 d,于末次给样 30 min 后,将小鼠置于水温为 30℃ 的游泳箱中不负重游泳 90 min(每箱一次放入 5 只),每次入水前均将水温调至 30℃,室温恒定在 25℃。游泳后立即处死取肝。用经典的蒽酮法^[3,8]测定肝糖原的含量。

具体操作步骤如下

将肝置于冰上的平皿内,经生理盐水漂洗后用滤纸吸干,精确称取 200 mg 肝放入离心管内,加入 5% 的三氯醋酸 4 mL,用匀浆器(28000 r/min)匀浆 1 min 后于 3000 r/min 离心 15 min,将上清液移入另一试管内。于沉淀内加入 5% 的三氯醋酸 4 mL,再匀浆 1 min 后离心 15 min,将上清液移入试管内与第一次离心的上清液合并,用振荡器充分混匀。取此上清液 1 mL 放入 10 mL 离心管中,加入 95% 或无水乙醇 4 mL,充分混匀至两种液体间不留有界面,用干净塞子塞上,室温下静置过夜。3000 r/min 离心 15 min,倒掉上清液后让试管倒置 10 min 滤干,于各试样管内加入蒸馏水 2 mL(标准管加入 100 mg/dL 葡萄糖标准液 0.5 mL 和蒸馏水 1.5 mL,试剂对照管加入蒸馏水 2 mL),振荡管子至糖原完全溶解,用力注入蒽酮试剂 10 mL,立即置于冰水内冷却至室温,等所有试管加完后,放入沸水中煮沸 15 min(水浴深度略高于管子液面),立即取出放入冰水中冷却至室温。于 620 nm 波长处比色测定吸光度(A)。用下列公式计算每 100 g 肝组织中糖原的毫克数。

每 100 g 肝组织中糖原的毫克数 =

$$\frac{DU}{DS} \times 0.5 \times \frac{8}{0.2} \times 100 \times 0.9$$

DU — 试样管吸光度

DS — 标准管吸光度
为 0.5 mL 葡萄糖标准液中的葡萄糖含量

8 — 为 0.2 g 肝组织的提取液体积

0.2 — 为取的肝组织重量(g)

将小鼠放入水温 30℃、水深 30 cm 的游泳箱中,每箱一次放入 5 只小鼠,不负重游泳 90 min。运动后休息 60 min,将眼睛周围擦干净,拔眼球取血约 0.5 mL,用二乙酰一肟法^[5]测定血清尿素氮。血清中尿素氮在冰箱内可稳定 24 h。

操作步骤如下 将血于 4℃ 冰箱静置 3~4 h,待凝固后,用针尖将血自管壁剥离,平衡后于 1500 r/min 离心 10~15 min,吸出血清。各取 20 μ L 血清加入试管中(标准管加入尿素氮标准液 20 μ L,试剂对照管加入蒸馏水 20 μ L),再加入二乙酰一肟应用液 3.0 mL、氯化铁磷酸应用液 2.5 mL,用振荡器充分混匀。于沸水中煮沸 10 min,立即取出置于冷水中冷却至室温,于 520 nm 波长比色测定吸光度(A)。用下面的公式计算血清尿素氮含量:

$$\text{尿素氮(mg/dL)} = \frac{A_{\text{试样}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times 20.0(\text{mg/dL})$$

2.3.4 血乳酸测定

操作程序 安静状态下采血,然后负体重 4% 的铅皮,于 30℃ 水中游泳 10 min,游后立即采血,安静 15 min、60 min 后分别采血,用乳酸测定仪测定。

试验方法如下 连续经口给样 30 d,于末次给样后 30 min 开始,用毛细管从内眦采血各 20 μ L,加入 40 μ L 破膜液中,充分混匀至透明。然后按体重的 4% 负重铅皮,固定于鼠尾根部,放入水温 30℃、水深 30 cm 的游泳箱中(为便于控制采血时间,每隔 1 min 放一只小鼠入水)游泳 10 min 后取出,立即用纱布或吸水纸擦干水,采血 20 μ L,再分别于休息 15 min 和 60 min 后各采血 20 μ L,加入 40 μ L 破膜液中,充分混匀至液体透明(不能产生血凝块,否则影响试验结果)。用乳酸测定仪测定血乳酸值(mmol/L)。

3 结果与讨论

3.1 游泳试验 试验过程中,以下因素明显影响试验结果。

3.1.1 运动强度 有的小鼠浮在水面不游,会使游泳时间显著延长,因此,要得到可靠结果,必须使每一只小鼠持续游泳,可用木棍在小鼠周围轻轻搅动。

3.1.2 负重 负重物的比重越小,浮力越大,小鼠游泳时间越长。因此负重物的比重应较大。右的人因

软,易于裁剪和捆绑,是较理想的负重材料。负重量以小鼠体重的 5% 为宜,负重物太重则小鼠下沉,太轻则游泳时间太长,不便于操作。实验时将铅皮固定于鼠尾的根部,固定的松紧度应适宜,太紧,鼠尾血液循环不畅,鼠尾发紫,同时,其功能会受影响而缩短游泳时间。

3.1.3 水温 水温在 30℃ 左右时小鼠的游泳时间

最长,水温过高、过低都会缩短其游泳时间。为便于操作,我们选用 25℃ 水温,该温度下既不至使小鼠游泳时间太长,又不会使小鼠肌肉痉挛(水温过低时肌肉痉挛,影响试验结果)。实验时应尽量使环境温度保持恒定在 25℃,以免水温下降而缩短游泳时间。各游泳箱水温相差不超过 0.1℃。不同条件下的游泳时间见表 1。

表 1 不同条件下小鼠的游泳时间

游泳条件	不负重 25℃	负重 5%、30℃	负重 5% 25℃
日期	96.4.19	96.6.6	96.7.9
动物数	10	16	12
游泳时间 s	9300 ± 2478	1224.5 ± 469.5	405.0 ± 151.2

由表 1 可见, 25℃、负重 5% 时,游泳时间最为合适(一般在 5~15 min)。游泳时室温与水温相同,每箱一次同时放入 5 只小鼠。

3.1.4 小鼠的批次 不同批次的小鼠(体重 35 g 左右)其游泳时间不同,但相对稳定,一般在 5~15 min。数据见表 2。

表 2 同一条件下不同批次小鼠的游泳时间

日期	96.7.8	96.7.9	96.8.16	96.8.19	96.11.19	96.12.17
动物数	12	12	15	15	12	15
游泳时间 s	371.7 ± 135.6	405.0 ± 151.2	554.9 ± 186.4	577.7 ± 204.9	648.8 ± 267.4	341.3 ± 140.2

由表 2 可见,不同批次小鼠的游泳时间不同,但相对稳定。游泳条件为:水温 25℃,负重 5% 的铅皮。游泳时室温与水温相同。

3.1.5 水深及游泳箱面积的大小 水深一般不低于 25 cm,若太浅,小鼠力竭下沉时可用脚蹬底而重新浮出水面,至使游泳时间延长。水的面积宜大不宜小,一般不小于 50 cm × 50 cm。

3.1.6 游泳箱内一次放入的小鼠数 一个水箱内同时放入的小鼠数不能太多,否则互相挤靠、踩碰,容易呛水而缩短游泳时间。同时放入的小鼠数越多,游泳时间越短。因此,同一试验的各剂量组一个水箱内同时入水的小鼠数应相同。本测验一次放入 5 只。

3.1.7 小鼠的性别 最好用雄性小鼠,其体能受性周期的影响较小。

3.2 肝糖原测定

试验表明,游泳 90 min 后小鼠肝糖原尚未耗竭,且与安静组差异有显著性(见表 3),故此时取材比较合适。水温对小鼠游泳时间影响很大,要保证小鼠游泳 90 min 而不致死亡,我们选用 30℃ 度。

影响肝糖原测定结果的因素有:

3.2.1 运动强度 剧烈运动 2 h 左右可以使肝糖原耗竭,可见,运动强度显著影响运动后肝糖原的含量,故试验过程中使每一只小鼠持续游泳是获得可靠结果的关键因素。见表 3。

表 3 运动对肝糖原的影响(吸光度 A)

运动情况	安静	30℃ 游泳 90 min
动物数	10	10
肝糖原(吸光度 A)	1.429 ± 0.206	0.436 ± 0.230
P	<0.001	

由表 3 可以看出,运动显著影响肝糖原的含量。

3.2.2 运动开始的时间 小鼠习性以夜间活动为主,进食也主要在夜间。试验开始的时间离进食时间越久,测定的肝糖原含量越低。我们于上午和下午分别进行过多次试验,结果均表明下午的肝糖原含量极低,很难比较各组的差异,上午显著高于下午(见表

4)。因此,试验应在上午进行,且同一受试物各组应在同一时点进行试验。

由表 4 可见,同等条件下,下午游泳后肝糖原含量极低,与上午进行的试验相比,差异有极显著性。(游泳条件为: 30℃、90 min)

表 4 不同时点游泳后的肝糖原含量

游泳时点	上午 8:30—9:30	下午 2:00—3:00
动物数	10	10
肝糖原(吸光度 A)	0.583 ± 0.430	0.007 ± 0.068
P	<0.001	

表 5 不同日期测得的肝糖原含量

日期	96.7.11	96.7.16	96.9.18	96.11.21	96.12.9
动物数		15	10	13	14
肝糖原量 (mg/100g 肝)	57.5 ± 35.5	565.5 ± 324.5	1928.0 ± 1246.0	11992.0 ± 7984.0	1390.0 ± 664.0

3.2.3 肝匀浆时间和糖原提取次数 肝组织匀浆时间的长短和糖原提取的次数均与肝糖原的提取率成正比,各试样匀浆时间和提取次数应保持一致。

3.2.4 显色反应的温度和时间 蒽酮法为显色反应,反应温度和时间都显著影响反应后颜色的深浅,应严格控制。各次试验测得的肝糖原含量差异非常大,可相差几百倍(见表 5),因此,每次试验必须设有对照组、标准管和空白管。

由表 5 可见,各次试验测得的肝糖原差异可达几百倍。蒽酮法为显色反应,反应温度和时间显著影响颜色深浅,因此,对照组、标准管和试剂对照的反应温度和时间应与受试物组完全一致。

3.2.5 反应后的测定时间 显色反应后应在 30 min 内完成比色测定,时间太长,颜色会逐渐变浅。

3.2.6 试样配方中糖含量的高低 试验中发现,有的试样其它抗疲劳试验指标均为阴性,唯独肝糖原含

量受试物组高于对照组,查验配方发现其本身糖含量较高。这也说明,单一生化指标阳性不能判定该产品有抗疲劳作用。

3.3 血清尿素氮测定

运动时间少于 30 min 时,蛋白质较少参与供能,血尿素氮变化不明显,较大负荷运动后,血尿素氮才明显增加,且蛋白质分解代谢加强不仅发生在不适应的运动时,还会延续到运动后的休息期,血中尿素氮可在运动后较长时间持续升高。^[4]因此,试验选择较大负荷的运动时间——游泳 90 min,在该负荷下运动所产生的尿素氮与安静时比,差异有显著性。选择合适的温度 30℃,该温度下小鼠能游完规定的时间而不致死亡。游泳后休息 60 min 采血,此时血尿素氮水平较高。该试验的影响因素相对较少,主要有:运动强度和显色反应的温度与时间。各次试验结果虽有差异,但相对稳定(见表 6)。

表 6 不同日期测得的小鼠血清尿素氮水平

日期	96.7.15	8.21	9.6	9.23	11.25	12.9
动物数	15	14	11	15	12	14
血清尿素氮 $\bar{x} \pm SD$	49.9 ± 12.0	42.4 ± 3.8	43.5 ± 8.1	41.7 ± 7.8	36.1 ± 4.2	42.2 ± 8.8

3.4 血乳酸测定

理论上,只有短时剧烈运动,乳酸产生量才增加,而“马拉松”式的运动并不能使血乳酸水平升高。^[6]因此试验应选择短时间剧烈运动。运动时产生的肌乳酸可以很快进入血液,因此测定运动前和运动后不同时间的血乳酸可以计算乳酸的产生和恢复速度。

我们比较了水温 30℃ 下,不负重游泳 90 min 和负重 4% 游泳 10 min、15 min 三种情况下的血乳酸水

平。结果表明:负重短时间游泳,血乳酸升高明显;不负重长时间游泳,血乳酸升高不明显。见表 7。试验结果与理论一致。故我们采用负重 4% 游泳 10 min 这一方案。

运动后立即采血测得的血乳酸值,与运动前血乳酸值之差,可以反映血乳酸升高速度,与运动后休息 15 min 或 60 min 测得的血乳酸值之差,可反映血乳酸消除速度。用不同方案进行试验,测得的血乳酸值

见表 7。

从表 7 可见,不负重游泳 90 min 这一方法,在运动后测得的血乳酸值均低于运动前的血乳酸水平,理论上是不成立的,出现这一结果的主要原因是:(1)“马拉松”式的运动血乳酸升高不明显,(2)游泳 90 min 时间太长,小鼠可能喝了较多的水使血液稀释而

降低了游泳后的血乳酸浓度。相比之下,负重 4% 游泳 10 min 这一方法,血乳酸产生速度快。小鼠喝水的机会也少得多,可见,后一方法测得的结果较为理想。此表还可看出,运动后立即采样,测得的血乳酸值最高,与有的文献报道的运动后 15 min 出现血乳酸峰值不同。^[7]

表 7 不同情况下血乳酸水平

mmol/L

游泳条件 日期	不负重 90 min	负重 4% 10 min	负重 4% 15 min
	96.9.6	96.12.17	96.11.28
动物数	11	11	12
运动前	4.34 ± 1.78	3.71 ± 0.52	3.02 ± 0.74
游泳后立即 (0 min)	3.00 ± 1.60	6.49 ± 1.98	6.00 ± 1.10
游泳后休息 (15 min)	2.46 ± 1.22	—	4.03 ± 1.22
游泳后休息 (60 min)	1.62 ± 0.89	2.18 ± 0.64	2.15 ± 1.06

影响血乳酸测定结果的因素 运动强度、运动时间、采血时毛上的水分是否擦干(有水分时血液被稀释,血乳酸浓度下降)、加入破膜液后是否充分混匀(有凝块时测定值低于实际值)等。

乳酸测定仪法快速、简便、灵敏、稳定可靠。没有乳酸测定仪的实验室,可用其它方法测定,如:改良 Barker - Summerson 氏法、改良 - Mac Queen 氏法、紫外分光酶法、改良酶电极法等。详见文献。^[4]但我

们所用的乳酸测定仪法最为简便、灵敏可靠。

综合以上各项试验可见,因影响因素较多,试验时每一试样的各项试验都必须设有对照组,而不能与“正常值”或某一次试验中对照组的结果进行比较。并且,不能凭单项试验结果下结论,需综合考虑才能判定所试试样是否有抗疲劳作用。

我们用所建方法对 10 个产品进行了检测,其中 4 个有抗疲劳作用。结果见表 8。

表 8 不同试样抗疲劳作用检测结果

试样号	游泳时间	肝糖原	血尿素氮	血乳酸升高速度	血乳酸消除速度	综合判定
1	—					无效
2	—					无效
3	—					无效
4	—	—	—	—	—	无效
5	↑	↑	↓	↓	—	有效
6	—	↑	—	—	—	无效
7	↑	↓	↓	↓	—	有效
8	↑	↑	↓	—	↑	有效
9	—	—	—	—	—	无效
10	↑	—	↓	—	↑	有效

注: — 差异无显著性

↑ 与对照组比,延长或升高。游泳时间、肝糖原和乳酸消除速度 ↑ 为阳性。

↓ 与对照组比,降低。血尿素氮和血乳酸升高速度 ↓ 为阳性。

[下接第 24 页]